

研究报告

Research Report

香青菜亚麻酸含量性状相关 miRNA 的鉴定

王镇^{1*} 刘照坤² 杜奕承¹ 陈素娟¹ 陈国元¹

1 苏州农业职业技术学院, 苏州, 215008; 2 苏州市农业科学院, 苏州, 215008

* 通信作者, 18962103126@189.com

摘要 本研究旨在发掘香青菜(*Brassica campestris* ssp.*chinensis* L. Makino, NHCC)中影响亚麻酸含量的相关 miRNA 及其对应靶基因, 探究他们的调控机制。以香青菜亚麻酸含量差异大的两个亚种‘绣花筋’和‘黑叶香青菜’的成熟叶片为材料, 采用小 RNA 高通量测序来鉴定两个材料中差异表达的 miRNA 且预测其靶基因, 并进行基因功能注释。试验共鉴定得到 miRNA 236 个, 包括 159 个已知 miRNA, 77 个新的 miRNA。筛选出差异表达的 miRNA 63 个, 其中, 以‘黑叶香青菜’为对照, 上调的有 28 个, 下调的 35 个。差异表达的 miRNA 对应的靶基因中共 6 041 个得到功能注释, 其涉及的主要通路多个与脂肪酸代谢相关, 如“ α - 亚麻酸代谢”、“脂肪酸合成”、“不饱和脂肪酸的生物合成”、“脂肪酸降解”等。差异表达 miRNA 的靶基因主要是一些亚麻酸合成或代谢重点的关键酶, 如脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)、3- 酮酰基 -CoA 硫酶 2 (3-ketoacyl-CoA thiolase, KCS)等。香青菜通过对这些 miRNA 在不同品种中的差异表达负调控 LOX 等脂肪酸代谢关键基因和 KCS 等亚麻酸合成相关基因的表达, 从而一方面减少亚麻酸的代谢损失, 另一方面增加亚麻酸的合成量, 从而引起亚麻酸含量的增高。

关键词 香青菜, 亚麻酸, 差异表达 miRNA, miRNA 靶基因

Identification of miRNA Associated with Linolenic Acid Content Traits in Xiangqingcai

Wang Zhen^{1*} Liu Zhaokun² Du Yicheng¹ Chen Sujuan¹ Chen Guoyuan¹

1 Suzhou Polytechnic Institute of Agriculture, Suzhou, 215008; 2 Suzhou Academy of Agricultural Sciences, Suzhou, 215008

* Corresponding author, 18962103126@189.com

DOI: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0009

Abstract The purpose of this study is to explore the miRNA and its target genes that affect linolenic acid content in Xiangqingcai (*Brassica campestris* ssp.*chinensis* L. Makino, NHCC), and to clarify its molecular function in the regulation of this character. In this research, using the mature leaves of 'xiuhujin' and 'Heiyexiangqingcai' which have largest difference in linolenic acid content as materials, the differentially expressed miRNA was identified by high-throughput microRNA sequencing, and the target gene function was predicted and further function annotated. In total 236 miRNAs were detected, of which 159 were known miRNA and 77 were novel ones. In these miRNAs, 28 were up-regulated and 35 were down regulated. A total of 6041 target genes corresponding to the differentially expressed miRNA were annotated, including many fatty acid metabolism pathways, such as " α -linolenic acid metabolism", "fatty acid synthesis", "unsaturated fatty acid biosynthesis" and "fatty acid degradation", etc. The

本文首次发表在《分子与植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2020 年 6 月 1 日; 接受日期: 2020 年 6 月 4 日; 发表日期: 2020 年 6 月 11 日

引用格式: 王镇, 刘照坤, 杜奕承, 陈素娟, 陈国元, 2020, 香青菜亚麻酸含量性状相关 miRNA 的鉴定, 分子植物育种(网络版), 18(9): 1-8 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0009) (Wang Z., Liu Z.K., Du Y.C., Chen S.J., and Chen G.Y., 2020, Identification of miRNA associated with linolenic acid content traits in Xiangqingcai, *Fengzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding (online)), 18(9): 1-8 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0009))

target genes of differential expressed miRNA mainly are some key enzymes of linolenic acid synthesis or metabolism, such as lipoxygenase (*LOX*), 3-ketoacyl-CoA thiolase (*KCS*), which play an important role in the synthesis and transformation of linolenic acid. Through negatively regulating their expression and other key genes of fatty acid metabolism and the related genes of linolenic acid synthesis such as *KCS* through the differential expression of these miRNAs in different varieties, on the one hand reduces the metabolism loss of linolenic acid, on the other hand increases the synthesis amount of linolenic acid, thus resulting in the increase of linolenic acid content.

Keywords Xiangqingcai, Linolenic acid, Differentially expressed miRNA, MiRNA target genes

香青菜是苏州地区地方传统特色蔬菜,栽培历史悠久,是一种具有浓郁油香的不结球白菜(*Brassica campestris ssp.chinensis* L. Makino, NHCC) (陈虎根等, 2004)。其下有 4 个亚种类型,分别是‘黑叶香青菜’、‘黄叶香青菜’、‘绣花筋’和‘黑杂一号’香青菜等,‘绣花筋’香味较淡,而另三者香味浓郁(杨雪梅等, 2007)。目前为止,这种奇特的香味只在香青菜中发现含有,然而,有关香青菜的各类研究报道还很少,大多停留在应用传统育种方法进行品种复壮、选育等方面,对于香青菜香味特别是亚麻酸含量的分子机理研究还处于起步阶段(杨雪梅等, 2012; 陈国元和张磊, 2016)。王桃云等(2017)对香青菜香味来源的挥发性芳香物质进行提取,并分析其成分。分析显示,香青菜香味主要化学成分为脂肪族、芳香族和萜类 3 大类化合物及其含氧衍生物。本人对香青菜通过 GC-MS 分析发现,‘黑叶香青菜’亚麻酸含量低,而‘绣花筋’亚麻酸含量高达近 50%。迄今为止,还未见关于香青菜亚麻酸含量相关的基因功能报道。

研究 miRNA 在植物的生长发育以及胁迫应答机制中的作用已逐渐成为热点(Cuperus et al., 2011)。miRNA 是广泛存在于生物体的普遍存在的非编码小分子 RNA,其长度约 20~24 nt。在植物中,miRNA 对发育进程、抗逆反应等起着重要的作用(Cho and Paszkowski, 2017; Luo et al., 2018)。在亚麻酸的生物合成中,miR158、miR159、miR166、miR167、miR172 调控脂肪酸去饱和酶的表达(王桃云等, 2017),而 miRNA156、miRNA172、miRNA393 等通过调控 *LOX* 基因的表达,降低亚麻酸的含量(Qiu et al., 2015)。

本研究对‘黑叶香青菜’和‘绣花筋’的成熟叶片进行高通量 miRNA 测序,鉴定两者表达量存在差异的 miRNA 并通过软件预测对应的靶基因,筛选出与亚麻酸代谢相关基因的同源基因,如脂氧合酶(*LOX*)、转氨酶和丙酮酸脱氨酶等(Hu et al., 2014),从而得到参与香青菜亚麻酸含量调控的 miRNA 及其对应靶基因,揭示香青菜亚麻酸含量甚至香味差异的分子机制。

1 结果与分析

1.1 测序数据分析

对测序技术得到的数据信息进行质量管理控制,全部 6 个样品的 clean Data 都超过 11.99 M,碱基数均大于 0.6 G (表 1)。经过去除带接头和低质量的序列,最终得到的 3 个‘绣花筋’样品的 Clean Reads 分别为 11.73 M、14.97 M 和 12.97 M,而‘黑叶香青菜’的 Clean Reads 则分别为 13.94 M、12.87 M、12.54 M。两个品种的 Q30 (质量值大于 30)值最低为 97.26%和 96.90%。

1.2 miRNA 的鉴定

在 miRBase (V21)中,将以上定位到参考序列上的 reads,和十字花科芸苔属序列进行比对,鉴定到的已知 miRNA 指的是 Reads 与库中已知 miRNA 完全相同的序列,得到‘绣花筋’和‘黑叶香青菜’库序列匹配上 miRNA 的详细情况,其中包括 miRNA 的序列信息、长度、二级结构等。结果共得到 miRNA 前体共 147,成熟的 miRNA 159 个(表 2)。具有发夹结构是 miRNA 前体的特殊标志,miREvo (Wen et al., 2012)和 mirdeep2 (Friedländer et al., 2012)等预测软件可鉴于此预测到新的 miRNA,对于没有比对到已知 miRNA 的 sRNA 序列,我们利用这两个软件来预测新 miRNA,结果共鉴定出新的 miRNA 前体 98 个,成熟 miRNA 共 77 个(成熟体命名格式按照 Bra-miR-n* 来,其中 * 为数字编号)。图 1 是部分鉴定得到的已知 miRNA 和新 miRNA 的二级结构示意图。

1.3 miRNA 家族分析

高通量测序得到的 159 个已知 miRNA 分别聚集到 30 余个 miRNA 基因家族中,每个家族拥有的 miRNA 的数目和表达量各有不同。图 2 显示了本试验鉴定出的有成员超过 3 个的 miRNA 家族,miR159、miR164 等 4 个家族在香青菜中都鉴定出 3 个成员,miR157、miR167 等 6 个家族都鉴定出 4 个成员,miR169 有 6 个成员,而 miR156 最多,有 7 个成员被

表 1 测序数据统计表

Table 1 Statistical table of sequencing data

样品	原始序列	碱基数	质量值大于 30 的百分比	去冗余序列
Sample	Reads	Bases	Q30	Clean Reads
XHJ-1	11 997 023	0.600 G	99.19%	11 733 361 (97.80%)
XHJ-2	15 244 631	0.762 G	99.25%	14 969 099 (98.19%)
XHJ-3	13 331 237	0.667 G	99.04%	12 966 051 (97.26%)
HY-1	14 389 133	0.719 G	99.29%	13 943 450 (96.90%)
HY-2	13 186 972	0.659 G	99.11%	12 868 224 (97.58%)
HY-3	12 835 950	0.642 G	99.38%	12 538 274 (97.68%)

表 2 香青菜 miRNA 的鉴定信息

Table 2 The identified miRNA information of Xiangqingcai

类型	成熟体	前体	sRNA 种类	总 sRNA 数
Types	Mapped mature	Mapped hairpin	Mapped uniq sRNA	Mapped total sRNA
已知 miRNA	159	147	9 657	1 200 586
Known miRNA				
新的 miRNA	77	98	8 163	181 971
Novel miRNA				

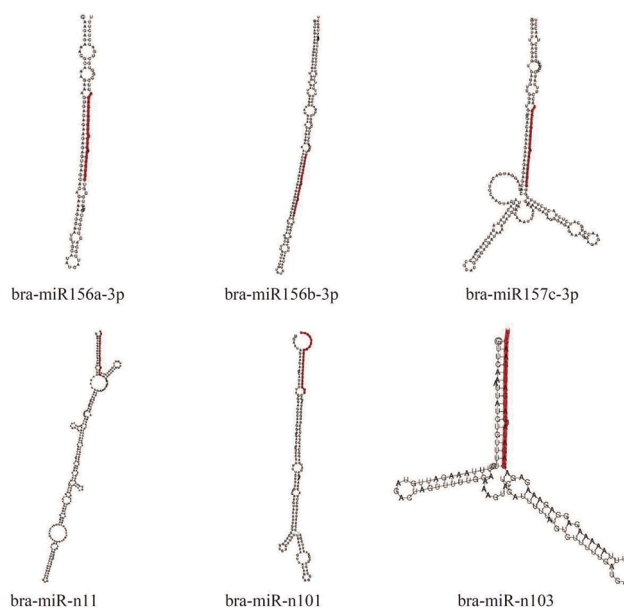


图 1 部分鉴定的香青菜 miRNA 二级结构示意图

注: 红色突出部分为成熟体所在

Figure 1 Part of the identified miRNA diagram of Xiangqingcai

Note: The red highlight is where the mature body is located

鉴定出(图 2)。其他 miRNA 家族鉴定出的已知 miRNA 基本为 1~2 个, 可能具有成员更多的 miRNA 家族在香青菜的香味调控中发挥更大的作用。

1.4 差异表达 miRNA 的鉴定分析

以 miRNA 表达分析中的 readcount 作为源数据, 随后使用 DESeq2 进行基于负二项分布的方法分

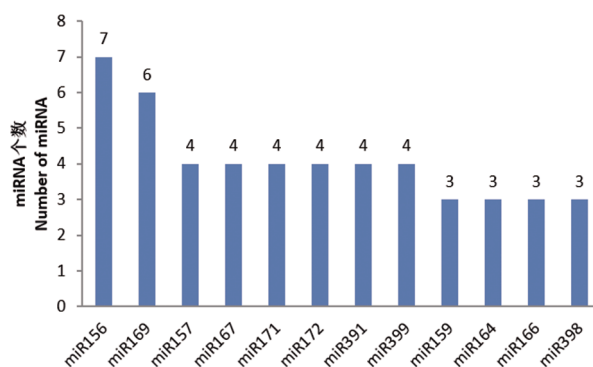


图 2 miRNA 家族中部分香青菜已知 miRNA 的含量

Figure 2 The number of Xiangqingcai known miRNAs in the miRNA family

析来鉴定两个样品间差异表达的 miRNA (Love et al., 2014)。试验共筛选出两个样本的差异表达 miRNA 共 63 个, 其中, 以‘黑叶香青菜’作为对照, 在‘绣花筋’中上调的 miRNA 有 28 个, 下调的有 35 个。已知的 miRNA 中, 有 35 个 miRNA 在两个品种中出现差异表达, 其中上调表达的有 12 个, 下调表达的有 23 个; 新的 miRNA 中, 共 28 个显示差异表达, 其中上调表达的 miRNA 有 16 个, 下调表达的 miRNA 有 12 个(表 3)。

1.5 靶基因预测

通过鉴定到的 miRNA 分别与其对应植物物种中基因的碱基数据, 使用 psRNATarget 进行靶基因

表 3 差异表达 miRNA 信息

Table3 The information of differentially expressed miRNAs

编号 No.	miRNA	调控水平 Regulated	编号 No.	miRNA	调控水平 Regulated
1	bra-miR5725	down	33	bra-miR-n79	down
2	bra-miR-n33	down	34	bra-miR-n42	down
3	bra-miR164c-5p	down	35	bra-miR9555a-3p	down
4	bra-miR-n85	down	36	bra-miR9557-5p	up
5	bra-miR-n125	down	37	bra-miR-n14	up
6	bra-miR158-3p	down	38	bra-miR-n136	up
7	bra-miR164a	down	39	bra-miR-n41	up
8	bra-miR9562-5p	down	40	bra-miR-n66	up
9	bra-miR391-5p	down	41	bra-miR-n72	up
10	bra-miR-n12	down	42	bra-miR319a	up
11	bra-miR165a-5p	down	43	bra-miR391-3p	up
12	bra-miR400-3p	down	44	bra-miR-n24	up
13	bra-miR400	down	45	bra-miR-n144	up
14	bra-miR5712	down	46	bra-miR-n3	up
15	bra-miR5716	down	47	bra-miR5711	up
16	bra-miR1885a	down	48	bra-miR5724	up
17	bra-miR-n122	down	49	bra-miR-n39	up
18	bra-miR158a-3p	down	50	bra-miR156a-3p	up
19	bra-miR-n137	down	51	bra-miR9558-3p	up
20	bra-miR9552a-5p	down	52	bra-miR845a	up
21	bra-miR9552b-3p	down	53	bra-miR-n135	up
22	bra-miR-n97	down	54	bra-miR156c-3p	up
23	bra-miR166a-5p	down	55	bra-miR-n83	up
24	bra-miR9566-5p	down	56	bra-miR157a-3p	up
25	bra-miR-n48	down	57	bra-miR-n4	up
26	bra-miR-n99	down	58	bra-miR-n152	up
27	bra-miR171b-3p	down	59	bra-miR390a-5p	up
28	bra-miR158-5p	down	60	bra-miR-n18	up
29	bra-miR9566-3p	down	61	bra-miR168a-3p	up
30	bra-miR824-5p	down	62	bra-miR-n109	up
31	bra-miR-n121	down	63	bra-miR-n145	up
32	bra-miR161-5p	down			

的预测,预测到靶基因的 miRNA 共有 234 个,靶基因数量为 17 036 个。这些 miRNA 中,有 159 个是已知的 miRNA,预测到靶基因 13 128 个;有 75 个是新的 miRNA,预测到靶基因有 3 908 个(表 4)。

1.6 香青菜差异表达 miRNA 的靶基因功能注释

1.6.1 GO 注释

对上述得到的靶基因进行功能比对注释,在注释库中得到了 63 个 miRNA 对应的注释,共计靶基因 6 041 个,包括 GO 注释库中 4556 个差异表达 miRNA 的靶基因和 KEGG 注释库中的 2 525 个靶基因。

通过进行 GO 在线分析,研究一共获得了 4 556 个差异表达 miRNA 的靶基因被注释到。这些靶基因共定位到 GO 的 29 个功能群当中,分别隶属于两个大的功能亚类,包括生物学过程亚类 (biological process, BP)9 个和分子功能亚类(molecular function, MF)20 个,分析中并没有发现与细胞组份相关的差异 miRNA 的靶基因。在生物学过程中,“蛋白质磷酸化”占比超过 40%,为最大的功能群,其次是“转录水平调控”、“酰胺代谢相关调控”、“转录后调控”、“蛋白质以及代谢过程调控”、“细胞蛋白代谢调控”等,占比均在 10%左右,而“病毒诱导的寄主细胞融合”则

表 4 香青菜中 miRNA 靶基因的预测数目

Table 4 Statistics of the predicted targets number of Xiangqingcai miRNAs

类型	miRNA 总数	预测到靶基因的 miRNA	靶基因
Types	Total of miRNA	miRNA with Targets	Target genes
已知 miRNA	159	159	13 128
Known miRNA			
新的 miRNA	77	75	3 908
Novel miRNA			
总计	236	234	17 036
Total			

占比最低,仅占 1%左右(图 3)。分子功能分类是差异表达 miRNA 靶基因注释到的最多的一类,除“转录调控活性”、“ADP 结合”和“ATP 合酶活性”这三类外,其他 17 类得到注释的靶基因均超过 800 个,而“水解酶活性”占比最多。

1.6.2 KEGG 通路分析

用 KEGG 对差异表达的 miRNA 的靶基因进行分析,发现其参与的主要通路有 20 条,其中,“植物病原相互作用”通路有 49 个靶基因注释到,占比 11.3%,41 条靶基因注释到“自噬调节”通路,占比 9.3%,31 条靶基因注释到脂肪酸代谢中,占比 7.0%，“过氧化物酶体”通路有 28 条靶基因注释到,其余包括“氨基酸代谢”、“磷酸肌醇代谢”、“核苷酸切除修复”等通路都有 20 条以上靶基因得到注释。值得注意的是,一些和脂肪酸代谢相关的通路,如“乙醛酸和二元酸代谢”、“脂肪酸降解”、“脂肪酸合成”、“不饱和脂肪酸的生物合成”、“脂肪酸延长”等都有 10 条以上基因得到注释,而与亚麻酸含量直接相关的“ α -亚麻酸代谢”通路也有 15 条靶基因注释(图 4)。

1.7 香青菜中与亚麻酸合成相关的 miRNA

根据靶基因功能注释的结果,对功能为“ α -亚麻酸代谢”的靶基因及其对应的差异表达 miRNA 进行重点分析,共发现 15 个靶基因及其对应的 15 个差异表达 miRNA,包括 bra-miR5711、bra-miR-n62、bra-miR9555a-3p、bra-miR-n165、bra-miR-n34、bra-miR158-5p、bra-miR397a、bra-miR845a、bra-miR390a-5p、bra-miR156a-3p、bra-miR5716、bra-miR824-5p、bra-miR-n136、bra-miR161-5p 和 bra-miR860-3p 等。其中,将‘黑叶香青菜’作为对照时,‘绣花筋’中 6 个 miRNA 的表达上调,上调幅度最大的是 bra-miR-n136,对应靶基因为 LOX6 同源基因;下调的有 9 个 miRNA,下调幅度最大的是 bra-miR5716,对应靶基因为 ACX-4 同源基因。

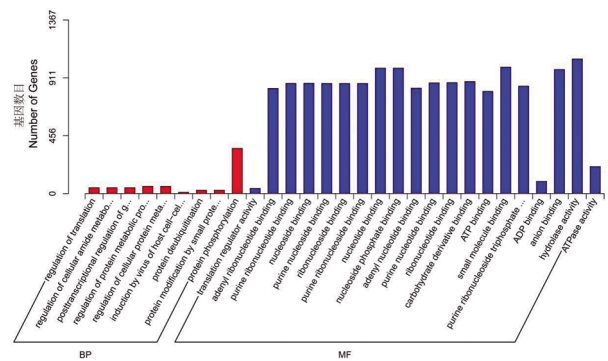


图 3 香青菜差异表达 miRNA 的靶基因 GO 注释

注:横坐标 GO 分类从左到右分别为 BP: 生物学过程(转录调控, 酰胺代谢调控, 转录后调控, 蛋白质代谢调控, 细胞蛋白代谢调控, 病毒诱导的宿主细胞融合, 蛋白质去泛素化, 小蛋白质联结和移除引发的蛋白质修饰, 蛋白质磷酸化)和 MF: 分子功能(转录调控活性, 腺苷核糖核苷结合, 嘌呤核糖核苷结合, 核苷酸结合, 嘌呤核苷酸结合, 核糖核苷酸结合, 嘌呤核苷酸结合, 核苷结合, 核苷酸结合, 腺苷核苷结合, 嘌呤核苷结合, 碳水化合物衍生物结合, ATP 结合, 小分子结合, 嘌呤核糖三磷酸结合, ADP 结合, 阴离子结合, 水解酶活性, ATP 合酶活性)。

Figure 3 GO annotation classification of differentially expressed miRNA target genes in Xiangqingcai

Note: The abscissa from left to right are BP: biological process (regulation of translation, regulation of cellular amide metabolic process, posttranscriptional regulation of gene expression, regulation of cellular protein metabolic process, induction by virus of host cell-cell fusion, protein deubiquitination, protein modification by small protein conjugation or removal, protein phosphorylation) and MF: molecular function (translation regulator activity, adenylyl ribonucleotide binding, purine ribonucleotide binding, nucleoside binding, purine nucleotide binding, nucleotide binding, nucleoside phosphate binding, adenylyl nucleotide binding, purine nucleotide binding, ribonucleotide binding, carbohydrate derivative binding, ATP binding, small molecule binding, purine ribonucleoside triphosphate binding, ADP binding, anion binding, hydrolase activity, ATPase activity)

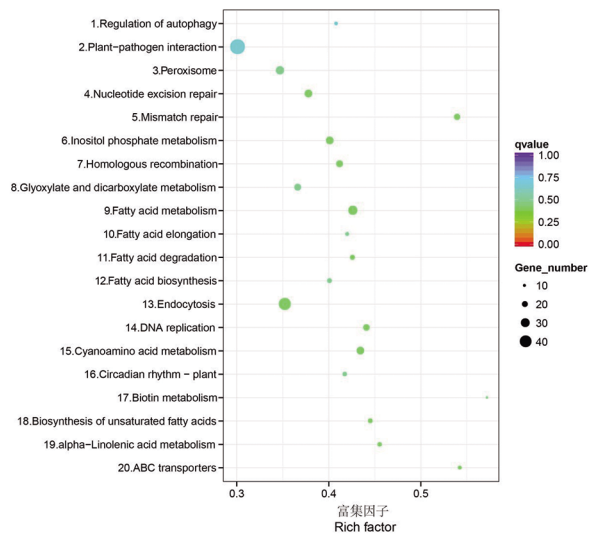


图 4 靶基因的 KEGG 通路注释

注: Rich factor 指差异表达的基因中在此通路的基因数目和此通路所有注释到的基因总数的比值; Qvalue 指多重假设检验校正得到的 Pvalue, 取值范围在 0~1 之间, 数值越小富集越明显; 1 自噬调节; 2 植物病原相互作用; 3 过氧化物酶体; 4 核苷酸切除修复; 5 错配修复; 6 肌醇磷酸酯代谢; 7 同源重组; 8 乙醛酸和二元酸代谢; 9 脂肪酸代谢; 10 脂肪酸延长; 11 脂肪酸降解; 12 脂肪酸生物合成; 13 内吞作用; 14 DNA 复制; 15 氰胺酸代谢; 16 昼夜节律 - 植物; 17 生物素代谢; 18 不饱和脂肪酸的生物合成; 19 α -亚麻酸代谢; 20 ABC 转运

Figure 4 KEGG annotation of the target genes

Note: Rich factor means the ratio between the number of differentially expressed genes in the pathway and the total number of genes in the same pathway; Qvalue means the pvalue that past the multiple hypothesis test and correction; The value range is 0~1; The closer to zero, the more significant the enrichment is; 1 Regulation of autophagy; 2 Plant-pathogen interaction; 3 Peroxisome; 4 Nucleotide excision repair; 5 Mismatch repair; 6 Inositol phosphate metabolism; 7 Homologous recombination; 8 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism; 9 Fatty acid metabolism; 10. Fatty acid elongation; 11 Fatty acid degradation; 12 Fatty acid biosynthesis; 13 Endocytosis; 14 DNA replication; 15 Cyanoamino acid metabolism; 16 Circadian rhythm-plant; 17 Biotin metabolism; 18 Biosynthesis of unsaturated fatty acids; 19 Alpha-Linolenic acid metabolism; 20 ABC transporters

2 讨论

植物的脂肪酸代谢系统中, 脂氧合酶(LOX)将亚油酸和亚麻酸是作为主要底物, 两者被其催化反应生成氢过氧化脂肪酸, 经过氢过氧化物裂解酶(HPL)的裂解作用继续转化为 C6、C9 醛类, 随后通过乙醇脱氢酶(ADH)的氧化反应形成对应的醇类物质, 酰基转移酶(AAT)参与醇类向酯类的转化(Inés et al., 2015;

Kim et al., 2015)。因而 LOX 基因的表达水平直接影响亚麻酸的含量。在本研究中, 有 4 个 LOX 基因 (LOX2, LOX3, LOX4 和 LOX6)作为差异表达 miRNA 的靶基因影响香青菜的亚麻酸含量, 其对应 miRNA 为 bra-miR5711、bra-miR-n62、bra-miR390a-5p、bra-miR156a-3p、bra-miR-n136 等。在这 5 个 miRNA 中, 虽然 bra-miR-n62 和 bra-miR156a-3p 在‘绣花筋’中表达量下调(log2 倍数分别是 -1.03 和 -0.76), 但其他 3 个均为上调且幅度较大, bra-miR-n136 更是只在‘绣花筋’中鉴定出, 为其特有的 miRNA, 其 readcounts 高达 172.23, 相较于‘黑叶香青菜’, 可靶向 LOX6 基因并大幅度降低其表达量, 再结合 bra-miR390a-5p 的上调对于 LOX2 的负调控, 表明了这种 miRNA 的调控机制可能对香青菜亚麻酸的含量多寡有十分关键的作用。

此外, bra-miR955a-3p 和 bra-miR-n-165 的靶基因功能注释为酰基辅酶 A 氧化酶 (Acyl-CoA oxidase, ACX), 其参与脂肪酸代谢下游醇类到酯类的转化(Adham et al., 2005), 后者是桃果实香味产生的主要来源, ACX 是该途径的关键限速酶(Arent et al., 2008; 齐玉洁等, 2012; Fan et al., 2017)。bra-miR955-5a-3p 和 bra-miR-n-165 在‘绣花筋’中的上调表达将抑制 ACX 基因的表达, 引起代谢过程中间产物的积累, 最终氢过氧化脂肪酸的累积将抑制 LOX 催化的亚麻酸的转化, 从而增加其在‘绣花筋’中的含量。脂肪酸代谢中, 上游关键基因 LOX 和下游关键基因 ACX 的表达水平降低, 使得亚麻酸更少的被代谢消耗, 而醇类、酯类等芳香物质的较少在表观上导致了‘绣花筋’的香味较‘黑叶香青菜’更淡。

差异表达 miRNA 中, bra-miR845a 靶向 4 个基因, 而后者都为 3-酮酰基-CoA 硫酶 2 基因(3-ke-toacyl-CoA thiolase, KCS)同源基因。KCS 是超长链单不饱和脂肪酸(VLCMFA)生物合成途径的关键酶, 而 VLCMFA 的合成前体主要以油酸为主(Deyu et al., 2015)。Liu 和 Li 的(2014)报道表明, 油酸是亚麻酸的重要合成前体。因而, VLCMFA 和亚麻酸存在对油酸这一共同合成前体的竞争关系, 当 VLCMFA 合成增多时, 必然无法产生较多的亚麻酸。在‘绣花筋’小 RNA 文库中, bra-miR845a 的 readcounts 为所有鉴定出的差异表达 miRNA 中最高的, 达到 1 223.13, 而‘黑叶香青菜’中该值为 286.99。这一 miRNA 的大幅表达水平差异将导致在‘绣花筋’中 KCS 基因的表达大幅抑制, 从而减少了油酸向 VLCMFA 的生物合成, 使得亚麻酸的合成有充足的前体使用。

本研究中,通过对亚麻酸含量差异较大的两个香青菜品种的高通量测序分析,得到15个和该性状高度相关的 miRNA 及其对应的15个参与“ α -亚麻酸代谢”通路的靶基因,其中有3个 miRNA 是新发现的(bra-miR-n62, bra-miR-n165 和 bra-miR-n136)。推测香青菜通过对这些 miRNA 在不同品种中的差异表达负调控 *LOX*、*ACX* 等脂肪酸代谢关键基因和 *KCS* 等亚麻酸合成相关基因的表达,从而一方面减少亚麻酸的代谢损失,另一方面增加亚麻酸的合成量,最终导致亚麻酸含量的增高(‘绣花筋’中)。本试验初步揭示了 miRNA 及其靶基因参与的香青菜亚麻酸含量性状调控的分子机理,为更好的研究和利用高含量亚麻酸品种的香青菜,更好的开发其保健作用打下理论基础。

3 材料与方法

3.1 试验材料

本试验所选用的材料为苏州蔬菜研究所提供的多年自交‘绣花筋’和‘黑叶香青菜’纯合种。2018年9月种植于苏州农业职业技术学院实训田,分别取其成熟期叶片提取总 RNA,每个品种取3组样品设为生物学重复。

3.2 试验方法

3.2.1 总 RNA 的提取及 smallRNA 文库构建

RNA 提取使用 TRIzol(Invitrogen)试剂盒,使用15%的 TBE-Urea 胶分离得到小 RNA。纯化的小 RNA 连上 5' 和 3' 接头(大小为 70~90 nt),设计接头引物并用其进行反转录 PCR 计15个循环,纯化后的扩增片段进行上机测序(Illumina/Solexa G1 sequencer)。使用 Small RNA Sample Pre Kit 试剂盒对合格的样品构建 cDNA 文库,利用小 RNA 的 5' 端和 3' 端分别有完整的磷酸分子基团和羟基的特征,以总 RNA 为初始材料,将 Small RNA 两端同时加上 5' 和 3' 接头(大小为 70~90 nt 左右),反转录 PCR15 个循环反应后合成 cDNA。再经过 PCR 进行分析扩增,PAGE 胶电泳方法分离目标的 DNA 片段,最后切胶回收得到两个不同材料共6个样品 cDNA 文库(‘绣花筋’: XHJ1-3, ‘黑叶香青菜’: HY1-3)。

3.2.2 miRNA 的鉴定与分析

原始 reads 经过去接头和过滤低质量后,将 cluster reads 依次与 Rfam 库、miRBase 库、RepBase 库等进行比对,获得小 RNA 的注释信息,并得到已有的,

以 sRNA 注释信息此作为预测新的 miRNA 的基础(Griffiths-Jones et al., 2008)。已知的 miRNA 鉴定分为两步:首先未注释的 sRNA 序列先与白菜 miRNA 进行比对,鉴定是否有已知的 miRNA,此过程不允许碱基错配;随后将未配对的剩余序列与植物所有 miRNA 进行比对,比对在其他植物中是否有已知 miRNA。若 sRNA 没有得到任何比对结果,则再通过 mireap 软件来预测新的 miRNA。检测 sRNA 上下游 100 bp 左右序列的 Dicer 酶切位点信息和能量特征,miRNA 的二级结构通过 RNAfold 工具预测得到。

3.2.3 差异表达 miRNA 的筛选及其靶基因功能注释

差异表达 miRNA 的筛选通过 IDEG6 软件进行分析,依据 fold-change (\log_2)>1 或者 fold-change (\log_2)<-1,且 P-value<0.01 鉴别 miRNA 在两个文库中是否存在显著表达差异。第一步是对两个样本中 miRNA 的表达量进行标准化处理(tags per million, TPM),然后用 TPM 计算 fold-change 和 P-value。利用在线软件 psRNATarget 对鉴定出的 miRNA 进行预测,得到其对应的靶基因信息。随后对差异表达 miRNA 的靶基因进行在线功能注释,使用的数据库主要为 GO (Gene Ontology, <http://www.geneontology.org/>)和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <https://www.kegg.jp/>) (郭强等, 2019)。

作者贡献

王镇和刘照坤是本研究的试验设计者和执行人;杜奕承是参与数据整理和论文初稿的写作;杜奕承、陈素娟、陈国元参与部分试验;王镇是项目的负责人,指导试验设计,数据统计,论文写作与修改。

致谢

本研究由江苏省高等学校自然科学研究面上项目(NO: 18KJB210010)和苏州市科技计划农业科技创新项目(NO: SNG2017057)共同资助。

参考文献

- Adham A.R., Zolman B.K., Millius A., and Bartel B., 2005, Mutations in arabidopsis acyl-coa oxidase genes reveal distinct and overlapping roles in 2-oxidation, *Plant J.*, 41(6): 859-874
- Arent S., Pye V.E., and Henriksen A., 2008, Structure and function of plant acyl-coa oxidases, *Plant Physiol. Biochem.*, 46(3): 292-301
- Chen H.G., Yang X.M., Jiang S.D., and Wang X.Y., 2004, The local characteristic variety of Suzhou -Xiangqingcai, Shang-

- hai Shucai (Shanghai Vegetables), (5): 22-23 (陈虎根, 杨雪梅, 蒋树德, 王香云, 2004, 苏州地方特色品种 - 香青菜, 上海蔬菜, (5): 22-23)
- Cuperus J.T., Fahlgren N., and Carrington J.C., 2011, Evolution and Functional Diversification of MIRNA Genes, *Plant Cell*, 23(2): 431-442
- Cho J., and Paszkowski J., 2017, Regulation of rice root development by a retrotransposon acting as a microRNA sponge, *eLife*, 6: e30038
- Chen G.Y., and Zhang L. 2016, Purification and rejuvenation of a new variety of Suzhou Dongshan Xiangqingcai, *Changjiang Shucai (Changjiang Vegetables)*, (13): 21-22 (陈国元, 张磊, 2016, 提纯复壮新品种苏州东山香青菜, *长江蔬菜*, (13): 21-22)
- Deyu T., Shian W., Lihao W., Jialin W., and Fuli L., 2015, The biosynthesis and metabolic engineering of very long-chain monounsaturated fatty acid, *Biotechnol. Bulletin*, 12: 80-84
- Fan J., Yu L., and Xu C., 2017, A central role for triacylglycerol in membrane lipid breakdown, fatty acid β -oxidation, and plant survival under extended darkness, *Plant Physiology*, 174(3): 1517
- Friedländer M.R., Mackowiak S.D., Na L., Wei C., and Nikolaus R., 2012, Mirdeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades, *Nucleic Acids Res.*, 40(1): 37-52
- Griffiths-Jones S., Saini H.K., Van D.S., and Enright A.J., 2008, Mirbase: tools for microRNA genomics, *Nucleic Acids Res.*, 36(Database issue): D154
- Guo Q., Wang Y.Z., Chen J.J., Zhou L., and Xu B., 2019, Identification of microRNA related to cytoplasmic male sterile line of Alfalfa, *Caodi Xuebao (Journal of Grassland)*, 27(5): 1138-1146 (郭强, 王英哲, 陈晶晶, 周仂, 徐博, 2019, 紫花苜蓿细胞质雄性不育系相关 microRNA 的鉴定, *草地学报*, 27(5): 1138-1146)
- Hu T., Zeng H., Hu Z., Qv X., and Chen G., 2014, Simultaneous silencing of five lox genes increases the contents of alpha linolenic acid and linoleic acid in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruits, *J. Agric. Food Chem.*, 62(49): 11988-11993
- Inés Ponce de León, Hamberg M., and Castresana C., 2015, Oxylipins in moss development and defense, *Front. Plant Sci.*, 6: 483
- Kim S.U., Kim K.R., Kim J.W., Kim S., and Park J.B., 2015, Microbial synthesis of plant oxylipins from γ -linolenic acid through designed biotransformation pathways, *J. Agric. Food Chem.*, 63(10): 2773-2781
- Liu L.Z., and Li J.N., 2014, QTL Mapping of Oleic Acid, Linolenic Acid and Erucic Acid Content in *Brassica napus* by Using the High Density SNP Genetic Map, *Scientia Agricultura Sinica*, 47(1): 24-32
- Love M.I., Huber W., and Anders S., 2014, Moderated estimation of fold change and dispersion for rna-seq data with *deseq2*, *Genome Biol.*, 15(12): 550
- Luo M., Gao Z., Li H., Li Q., Zhang C., and Xu W., 2018, Selection of reference genes for mirna qrt-pcr under abiotic stress in grapevine, *Sci. Rep.*, 8(1): 4444
- Qi Y.J., Zhang X., Yang X., Gao Z.S., and Jia H.J., 2012, Cloning and expression analysis of acyl coenzyme A oxidase gene of "hujingmeilu" peach fruit, *Zhongguo Nongye Kexue (Agricultural Science in China)*, 45(9): 1758-1765 (齐玉洁, 张鑫, 杨夏, 高中山, 贾惠娟, 2012, '湖景蜜露'桃果实酰基辅酶A氧化酶编码基因的克隆及表达分析, *中国农业科学*, 45(9): 1758-1765)
- Qiu Z., Li X., Zhao Y., Zhang M., Wan Y., Cao D., Lu S., and Lin J., 2015, Genome-wide analysis reveals dynamic changes in expression of microRNAs during vascular cambium development in chinese fir, *cunninghamia lanceolata*, *J. Exp. Botany*, 66(11): 3041-3054
- Wang T.Y., Jiang W.N., Hu C.Y., Li Q., Shen X.L., and Lv H.C., 2017, Study on the extraction, chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from Xiangqingcai, *Zhongguo Liangyou Xuebao (Chinese Journal of Grain and Oil)*, 32(3): 81-87 (王桃云, 蒋伟娜, 胡翠英, 李倩, 沈雪林, 吕海超, 2017, 香青菜挥发油提取及化学成分和抑菌活性研究, *中国粮油学报*, 32(3): 81-87)
- Wen M., Shen Y., Shi S., and Tang T., 2012, Mirevo: an integrative microRNA evolutionary analysis platform for next-generation sequencing experiments, *BMC Bioinformatics*, 13(1): 140
- Yang X.M., Jiang S.D., Yin Y.L., Dong J.M., and Xu M., 2007, Breeding of common Chinese cabbage Heiza-1. *Zhongguo Shucai (Chinese Vegetables)*, 1(4): 29-30 (杨雪梅, 蒋树德, 尹渝来, 董建明, 徐溟, 2007, 普通白菜(香青菜)黑杂-1号的选育, *中国蔬菜*, 1(4): 29-30)
- Yang X.M., Han J.J., Zhang S., and Chen H.G., 2012, Breeding of new cabbage variety hanxiangqingcai, *Henan Nongye Kexue (Henan Agricultural Sciences)*, 41(11): 114-116 (杨雪梅, 韩建军, 张胜, 陈虎根, 2012, 小白菜新品种寒香青菜的选育, *河南农业科学*, 41(11): 114-116)